

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-302498

(P2002-302498A)

(43) 公開日 平成14年10月18日 (2002. 10. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 H 19/173		C 0 7 H 19/173	4 B 0 6 4
19/20		19/20	4 C 0 5 7
C 1 2 P 19/38		C 1 2 P 19/38	
// (C 1 2 P 19/38		C 1 2 R 1:19	
C 1 2 R 1:19)			
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-104777(P2001-104777)

(22) 出願日 平成13年4月3日 (2001. 4. 3)

(71) 出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 松葉 泰子

福岡県大牟田市浅牟田町30 三井化学株式会社内

(72) 発明者 石橋 大樹

福岡県大牟田市浅牟田町30 三井化学株式会社内

(72) 発明者 長原 清輝

福岡県大牟田市浅牟田町30 三井化学株式会社内

最終頁に続く

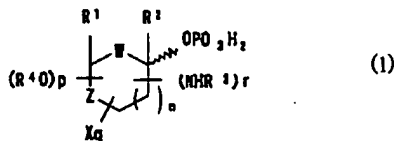
(54) 【発明の名称】 ヌクレオシドの工業的な製造法

(57) 【要約】

【課題】 1-リン酸化糖誘導体を結晶として単離することなく、ヌクレオシドを製造する方法を提供すること。

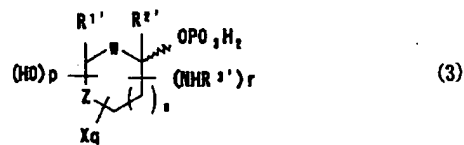
【解決手段】 一般式 (1)

【化1】



で示される化合物またはそれらの塩から、 R^1 及び R^2 のヒドロキシメチル基、カルボキシル基の保護基、または R^4 の水酸基の保護基を脱離後、リン酸基と核酸塩基との交換反応により、ヌクレオシドを合成する方法において、脱離反応およびリン酸基と塩基との交換反応を水性溶媒中で行うことによって、一般式 (3)

【化2】

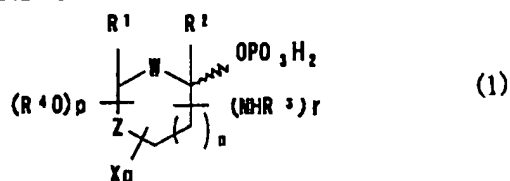


で示される上記化合物またはそれらの塩を結晶として単離することなく製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1) [化1]

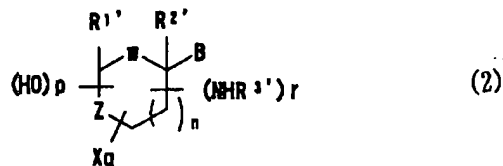
【化1】



〔式中、 R^1 および R^2 は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、保護されたヒドロキシメチル基または保護されたカルボキシル基を表し、 R^3 はアシル基、スルホニル基を表し、 R^4 は水酸基の保護基を表し、 X はハロゲン原子、アルコキシ基またはアルキルチオ基を表し、 W は酸素原子またはイオウ原子を表し、 Z は酸素原子、イオウ原子または置換されてもよい炭素原子を表す。また、 n は0または1を表し、 p および q は0から4の整数を表し、 r は0または1を表す。(ただし、 p 、 q 、 r 、 n は、 Z が酸素原子、イオウ原子の場合には、 $p+r \leq n+1$ 、 $q \leq 2 \times (n+1) - 2 \times (p+r)$ を、 Z が炭素原子の場合は $p+r \leq n+2$ 、 $q \leq 2 \times (n+2) - 2 \times (p+r)$ を満たす。)〕で示される化合物またはそれらの塩から、 R^1 及び R^2 のヒドロキシメチル基、カルボキシル基の保護基、または R^4 の水酸基の保護基を脱離後、リン酸基と塩基との交換反応により、一

般式(2) [化2]

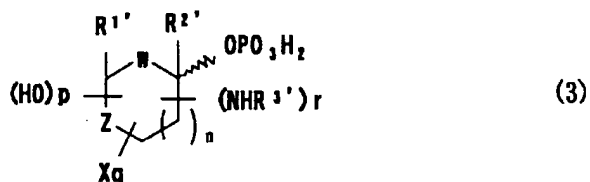
【化2】



(式中、 B は、独立してそれぞれピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群から選択された塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。また、 R^1 および R^2 は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、ヒドロキシメチル基またはカルボキシル基を表し、 R^3 は水素原子またはアシル基、スルホニル基を表し、 X 、 W 、 Z 、 n 、 p 、 q 、 r は前記と同義である。)で示される上記のヌクレオシドを合成する方法において、脱離反応およびリン酸基と塩基との交換反応を水溶性溶媒中で行うことによって、一般式(3)

【化3】

【化3】



(式中、 R^1 および R^2 、 R^3 、 X 、 W 、 Z 、 n 、 p 、 q 、 r は前記と同義である。)で示される上記化合物またはそれらの塩を結晶として単離することなく製造することを特徴とするヌクレオシドの工業的な製造法。

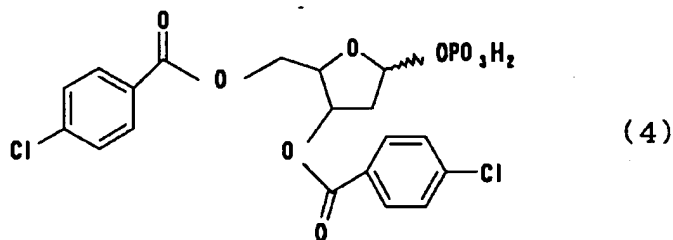
【請求項2】 脱離反応に、アルカリ金属炭酸塩、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類金属の炭酸塩又は水酸化物、水酸化アンモニウム類、または1級のアルキルアミン、2級のアルキルアミン、3級のアルキルアミンから選ばれる一種又は二種以上の塩基を用いることを特徴

とする請求項1記載のヌクレオシドの製造法。

【請求項3】 脱離反応及びリン酸基と塩基との交換反応で使用される水溶性溶媒が、水、アルコール類、エーテル類または水と前記溶媒との混合液のいずれかであることを特徴とする請求項1又は2記載の製造法。

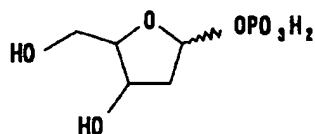
【請求項4】 一般式(1)で示される化合物が下記式(4)で表される化合物またはそれらの塩

【化4】



であり、一般式(3)で示される化合物が下記式(5)で表される化合物またはそれらの塩

【化5】



(5)

である請求項1、2又は3記載の製造法。

【請求項5】 一般式(2)中のBがアデニン、またはグアニンである請求項1～4記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

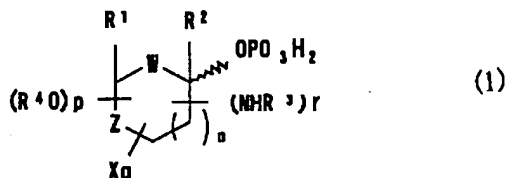
【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、汎用性の高いヌクレオシド化合物を製造する方法に関する。更に詳しく説明すれば、ヌクレオシド化合物の原料である一般式

(1)

【0002】

【化6】

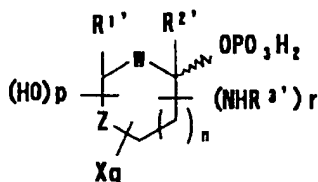


(1)

〔式中、R¹およびR²は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、保護されたヒドロキシメチル基または保護されたカルボキシル基を表し、R³はアシル基、スルホニル基を表し、R⁴は水酸基の保護基を表し、Xはハロゲン原子、アルコキシ基またはアルキルチオ基を表し、Wは酸素原子またはイオウ原子を表し、Zは酸素原子、イオウ原子または置換されてもよい炭素原子を表す。また、nは0または1を表し、pおよびqは0から4の整数を表し、rは0または1を表す。(ただし、p、q、r、nは、Zが酸素原子、イオウ原子の場合には、p+r ≤ n+1、q ≤ 2×(n+1)-2×(p+r)を、Zが炭素原子の場合はp+r ≤ n+2、q ≤ 2×(n+2)-2×(p+r)を満たす。)]で示される化合物から一般式(3)

【0003】

【化7】



(3)

(R¹ およびR² は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、ヒドロキシメチル基またはカルボキシル基を表し、R³ は水素原子またはアシル基、スルホニル基を表し、X、W、Z、n、p、q、rは前記と同義である。)で示される中間化合物を結晶として単離することなく、ヌクレオシド化合物を安定的に製造する工業的な製造方法に関する。ヌクレオシドは、抗ウイルス医薬品、抗ガン医薬品やアンチセンス医薬品などの原料または原体として使用される重要な医薬中間体である。

【0004】

【従来の技術】ヌクレオシドの製造法としては、ヌクレオシドホスホリラーゼの逆反応を利用した各種ヌクレオシドの合成法が以前より知られている。

【0005】ヌクレオシドホスホリラーゼは次式で表わされる反応を触媒し、この反応は可逆的である。

【0006】ヌクレオシド+リン酸(塩) → 塩基 + 1-リン酸化糖誘導体合成法の例としては、2'-デオキシリボース1-リン酸と核酸塩基(チミン、アデニンまたはグアニン)からチミジン(特開平01-104190号公報)、2'-デオキシアデノシン(特開平11-137290号公報)または2'-デオキシグアノシン(特開平11-137290号公報)を製造する

方法が開示されている。しかしながら、これらの製法では高価なヌクレオシドを原料として使用するために、コスト的に満足のできる製法ではない。

【0007】更に、この酵素反応の原料となる1-リン酸化糖誘導体は、化学合成が極めて難しいことが知られている。

【0008】医薬中間体として今後更に供給量が増すと考えられるヌクレオシドの製法に関して、本発明者らが1-リン酸化糖誘導体を経由する合成方法の検討を行った結果、1-リン酸化糖誘導体は、その結晶の性質から汚過性が非常に悪く、そのために単離操作が困難であることが分かった。よって、工業規模で1-リン酸化糖誘導体を単離するためには、大規模な設備投資を必要とし、工業的製法としては問題があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、一般式(1)で示される化合物またはそれらの塩から、一般式(3)で示される1-リン酸化糖誘導体を結晶として単離することなく、ヌクレオシドを製造する方法を提供することにある。

【0010】すなわち、本発明の課題は、抗ウイルス剤、アンチセンス医薬品などの原料または原体として使

用されるヌクレオシドを大規模な設備投資を必要とすることなく、工業規模で製造する方法を提供することにある。

【0011】

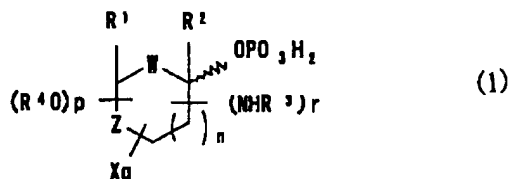
【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成するべく鋭意検討を行い、一般式(1)で示される化合物またはそれらの塩から保護基の脱離反応およびリン酸基と塩基との交換反応を水溶性溶媒中で行うことによって、結晶として単離することなく、ヌクレオシドを製造することが可能であることが分かった。この知見により、汎用性の悪い一般式(3)で示される中間化合物を結晶として単離することなく工業的な規模でヌクレオシドの製造を可能し、本発明を完成するに至った。

【0012】すなわち、本発明は、

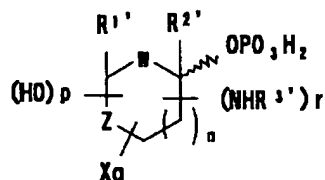
〔1〕一般式(1)〔化8〕

【0013】

〔化8〕



〔式中、R¹およびR²は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、保護されたヒドロキシメチル基または保護されたカルボキシ基を表し、R³はアシル基、スルホニル基を表し、R⁴は水酸基の保護基を表し、Xはハロゲン原子、アルコキシ基またはアルキルチオ基を表し、Wは酸素原子またはイオウ原子を表し、Zは酸素原子、イオウ原子または置換されてもよい炭素原子を表す。また、nは0または1を表し、pおよびqは0から4の整数を表し、rは0または1を表す。ただし、p、q、r、nは、Zが酸素原子、イオウ原子の場合には、p+

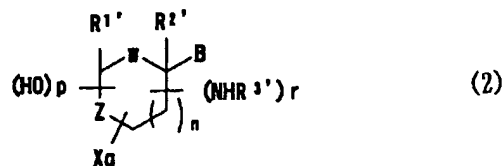


〔式中、R¹'およびR²'、R³'、X、W、Z、n、p、q、rは前記と同義である。〕で示される上記化合物またはそれらの塩を結晶として単離することなく製造することを特徴とするヌクレオシドの工業的な製造法。〔2〕脱離反応に、アルカリ金属炭酸塩、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類金属の炭酸塩又は水酸化物、水酸化アンモニウム類、または1級のアシルアミン、2級のアシルアミン、3級のアシルアミンから選ばれる一種又は二種以上の塩基を用いることを特徴とする〔1〕

$r \leq n+1$ 、 $q \leq 2 \times (n+1) - 2 \times (p+r)$ を、Zが炭素原子の場合は $p+r \leq n+2$ 、 $q \leq 2 \times (n+2) - 2 \times (p+r)$ を満たす。)〕で示される化合物またはそれらの塩から、R¹及びR²のヒドロキシメチル基、カルボキシ基の保護基、またはR⁴の水酸基の保護基を脱離後、リン酸基と塩基との交換反応により、一般式(2)〔化9〕

【0014】

〔化9〕



〔式中、Bは、独立してそれぞれピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群から選択された塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。また、R¹'およびR²'は、独立してそれぞれ水素原子、メチル基、ヒドロキシメチル基またはカルボキシ基を表し、R³'は水素原子またはアシル基、スルホニル基を表し、X、W、Z、n、p、q、rは前記と同義である。〕で示される上記のヌクレオシドを合成する方法において、脱離反応およびリン酸基と塩基との交換反応を水溶性溶媒中で行うことによって、一般式(3)

〔化10〕

【0015】

〔化10〕

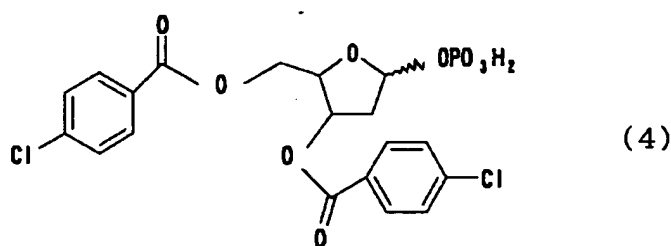
記載のヌクレオシドの製造法。

〔3〕脱離反応及びリン酸基と塩基との交換反応で使用される水溶性溶媒が、水、アルコール類、エーテル類、または水と前記溶媒との混合液のいずれかであることを特徴とする〔1〕又は〔2〕記載の製造法。

〔4〕一般式(1)で示される化合物が下記式(4)で表される化合物またはそれらの塩 〔化11〕

【0016】

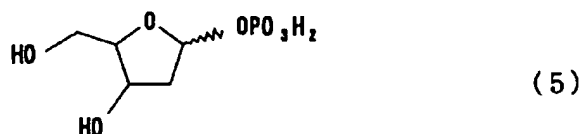
〔化11〕



であり、一般式(3)で示される化合物が下記式(5)
である化合物またはそれらの塩 [化12]

【0017】

【化12】



である[1]～[3]記載の製造法。

【5】一般式(2)中のBがアデニン、またはグアニン
である[1]～[4]記載の製造法を提供するものである。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】一般式(1)中のR¹又はR²で表される保護されたヒドロキシメチル基、およびR⁴で表わされる水酸基の保護基とは、加水素分解、加水分解、光分解のような化学的方法によって除去される保護基を指す。そのような基としては、ホルミル基、アシル基、シリル基、アルキル基、アラルキル基、カルボニル基があり、中でも好ましくは、ホルミル基、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、シリル基、アルコキシアルキル基、ハロゲン化アルキル基、アラルキル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基が挙げられる。

【0020】脂肪族アシル基としては、アルキルカルボニル基またはハロゲン置換された低級アルキルカルボニル基が挙げられる。

【0021】上記のアルキルカルボニル基の具体例として、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ヒパロイル基、バレリル基、イソバレリル基、オクタノイル基、ノニルカルボニル基、デシルカルボニル基、3-メチルノニルカルボニル基、8-メチルノニルカルボニル基、3-エチルオクチルカルボニル基、3,7-ジメチルオクチルカルボニル基、ウンデシルカルボニル基、ドデシルカルボニル基、トリデシルカルボニル基、テトラデシルカルボニル基、ペンタデシルカルボニル基、ヘキサデシルカルボニル基、1-メチルペンタデシルカルボニル基、14-メチルペンタデシルカルボニル基、13,13-ジメチルテトラデシルカルボニル基、ヘプタデシルカルボニル基、15-メチルヘキサデシルカルボニル基、オクタデシルカルボニル基などを例示することができる。

【0022】また、ハロゲン置換された低級アルキルカルボニル基の具体例として、クロロアセチル基、ジクロ

ロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基などを例示することができる。

【0023】芳香族アシル基としては、アリールカルボニル基、ハロゲン置換されたアリールカルボニル基、低級アルキルアリールカルボニル基、低級アルコシアリールカルボニル基、ニトロアリールカルボニル基、低級アルコシカルボニルアリールカルボニル基、アリールアリールカルボニル基を挙げることができる。

【0024】上記のアリールカルボニル基の具体例として、ベンゾイル基、 α -ナフトイル基、 β -ナフトイル基などを例示することができる。

【0025】また、ハロゲン置換されたアリールカルボニル基の具体例として、2-フルオロベンゾイル基、3-フルオロベンゾイル基、4-フルオロベンゾイル基、2-クロロベンゾイル基、3-クロロベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基、2-ブロモベンゾイル基、3-ブロモベンゾイル基、4-ブロモベンゾイル基、2,4-ジクロロベンゾイル基、2,6-ジクロロベンゾイル基、3,4-ジクロロベンゾイル基、3,5-ジクロロベンゾイル基などを例示することができる。

【0026】また、低級アルキルアリールカルボニル基の具体例として、2-トルイル基、3-トルイル基、4-トルイル基、2,4,6-トリメチルベンゾイル基などを例示することができる。

【0027】さらに、低級アルコシアリールカルボニル基の具体例として、2-アニソイル基、3-アニソイル基、4-アニソイル基などを例示することができる。

【0028】ニトロアリールカルボニル基の具体例として、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、3,5-ジニトロベンゾイル基などを例示することができる。

【0029】さらに、低級アルコシカルボニルアリールカルボニル基の具体例として、2-(メトキシカルボニル)ベンゾイル基などを、アリール化アリールカルボニル基の具体例として、4-フェニルベンゾイル基など

を例示することができる。

【0030】シリル基としては、低級アルキルシリル基、アリアル基で置換された低級アルキルシリル基を挙げることができる。

【0031】低級アルキルシリル基の具体例として、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、トリイソプロピルシリル基を例示することができる。

【0032】アリアル基で置換された低級アルキルシリル基の具体例として、ジフェニルメチルシリル基、ジフェニルイソプロピルシリル基、フェニルジイソプロピルシリル基などを例示することができる。

【0033】アラルキル基としては、低級アルキル基で置換されたアラルキル基、低級アルコキシ基で置換されたアラルキル基、ニトロ基で置換されたアラルキル基、ハロゲン置換されたアラルキル基、シアノ基で置換されたアラルキル基を挙げることができる。

【0034】これらの具体的な基を例示すると、2-メチルベンジル基、3-メチルベンジル基、4-メチルベンジル基、2, 4, 6-トリメチルベンジル基、2-メトキシベンジル基、3-メトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基、2-ニトロベンジル基、3-ニトロベンジル基、4-ニトロベンジル基、2-クロロベンジル基、3-クロロベンジル基、4-クロロベンジル基、2-ブロモベンジル基、3-ブロモベンジル基、4-ブロモベンジル基、2-シアノベンジル基、3-シアノベンジル基、4-シアノベンジル基などが挙げられる。

【0035】アラルキルオキシカルボニル基としては、低級アルキル基で置換されたアラルキルオキシカルボニル基、低級アルコキシ基で置換されたアラルキルオキシカルボニル基、ニトロ基で置換されたアラルキルオキシカルボニル基、ハロゲン置換されたアラルキルオキシカルボニル基、シアノ基で置換されたアラルキルオキシカルボニル基を挙げることができる。

【0036】これらの具体例として、2-メチルベンジルオキシカルボニル基、3-メチルベンジルオキシカルボニル基、4-メチルベンジルオキシカルボニル基、2, 4, 6-トリメチルベンジルオキシカルボニル基、2-メトキシベンジルオキシカルボニル基、3-メトキシベンジルオキシカルボニル基、4-メトキシベンジルオキシカルボニル基、2-ニトロベンジルオキシカルボニル基、3-ニトロベンジルオキシカルボニル基、4-ニトロベンジルオキシカルボニル基、2-クロロベンジルオキシカルボニル基、3-クロロベンジルオキシカルボニル基、4-クロロベンジルオキシカルボニル基、2-ブロモベンジルオキシカルボニル基、3-ブロモベンジルオキシカルボニル基、4-ブロモベンジルオキシカルボニル基、2-シアノベンジルオキシカルボニル基、3-シアノベンジルオキシカルボニル基、4-シアノベ

ンジルオキシカルボニル基などを挙げることができる。

【0037】アルコキシカルボニル基としては、低級アルコキシカルボニル基、ハロゲン置換されたアルコキシカルボニル化合物、アルキルシリル基で置換されたアルコキシカルボニル基を挙げることができる。

【0038】低級アルコキシカルボニル基の具体例として、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基、sec-ブトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基などを例示することができる。

【0039】ハロゲン置換されたアルコキシカルボニル基の具体例として、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基を、低級アルキルシリル基で置換されたアルコキシカルボニル基の具体例として、2-トリメチルシリルエトキシカルボニル基などを例示することができる。

【0040】アルキル基としては、メトキシメチル基、エトキシメチル基、2-メトキシエチル基、2-メトキシエトキシメチル基のようなアルコシアルキル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基のようなハロゲン化アルキル基、ベンジル基、 α -ナフチルメチル基、 β -ナフチルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基のようなアリアル基で置換された低級アルキル基が挙げられる。

【0041】これらの中で、好ましくは、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、アラルキル基であり、さらに好ましくは、4-トルイル基、4-クロロベンゾイル基、またはベンジル基である。

【0042】また、一般式(1)のR¹およびR²という保護されたカルボキシル基における保護基とは、加水素分解、加水分解、光分解のような化学的方法によって除去される保護基を指す。そのような基としては、好ましくは、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基のような低級アルキル基、2-(トリメチルシリル)エチル基、2-(トリエチルシリル)エチル基のようなシリル化された低級アルキル基あるいは前述のアラルキル基、アルコシアルキル基などを挙げることができる。さらに好ましくは、メチル基、tert-ブチル基、またはベンジル基である。

【0043】Xで示すハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を示す。

【0044】Xでいうアルコキシ基、アルキルチオ基としては、例えば、前述の低級アルキル基、アラルキル基、アルコシアルキル基を有するアルコキシ基、アルキルチオ基を挙げることができる。さらに好ましくは、メトキシ基、メトキシエトキシ基、メチルチオ基である。

【0045】Zが示す置換されてよい炭素原子とは、一般式で表した置換基が1つないし2つ置換した炭素原子

を表し、置換していない場合には、水素原子で置換されている炭素原子を指す。

【0046】一般式(1)中の R^3 というアシル基としては、例えば、前述の脂肪族アシル基、芳香族アシル基、アルコキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基、さらに R^3 というスルホニル基としては、メタンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基のような低級アルカンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基のようなアリールスルホニル基を挙げることができる。 R^3 として好ましくは、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、低級アルカンスルホニル基であり、具体的には、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基である。

【0047】一般式(1)及び(3)で表される化合物が有する糖残基としては、好ましくは天然型単糖由来の残基、非天然糖由来の残基、糖残基誘導体、ハロゲン化糖残基を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。例えば、フコース、ラムノース、ジギトキソース、オレアンドロース、キノボースのような6-デオキシ糖類、アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロースのようなヘキソース類、リボース、アラビノース、キシロース、リキソースのようなペントース類、エリトロース、トレオースのようなテトロース類、グルコサミン、ダウノサミンのようなアミノ糖類、グルクロン酸、ガラクトツロン酸のようなウロン酸類、プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース、ペンツロースのようなケトース類、2-デオキシリボースのようなデオキシ糖類といったD系列もしくはL系列よりなる天然型単糖由来の残基、ピラノース型あるいはフラノース型の非天然糖由来の残基があげられる。並びにそれらが有する水酸基および/またはアミノ基が保護もしくはアシル化された糖残基誘導体、またはそれらが有する水酸基がフッ素などのハロゲン原子で置換されたハロゲン化糖残基を有する糖類が挙げられる。

【0048】本発明の一般式(1)及び(3)～(5)で表される化合物が採りうる塩とは、化合物が分子内に有するリン酸基が形成する塩を示す。塩としては、ナトリウム、カリウム、リチウムのようなアルカリ金属の塩、マグネシウム、カルシウム、バリウムのようなアルカリ土類金属の塩、アルミニウム、鉄のような金属の塩、アンモニウム塩、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ブチルアミン、ヘキシルアミン、オクチルアミンのようなアルキルアミン類、シクロヘキシルアミンのようなシクロアルキルアミン類、ベンジルアミンのような1級アミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジブチルアミン、ジヘキシルアミン、ジオクチルアミンのようなジアルキルアミン類、ジシクロヘキシルアミンのようなジシクロアルキ

ルアミン類、ピペリジン、モルフォリン、N-メチルピペラジンのような環状アミンのような2級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、N-エチルジイソプロピルアミン、トリブチルアミン、トリヘキシルアミン、トリオクチルアミン、N-エチルジシクロヘキシルアミン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルフォリン、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンのような3級アミンの塩が挙げられる。

【0049】その他、アニリン、N, N-ジメチルアニリン、N, N-ジエチルアニリン、N, N-ジブチルアニリン、N, N-ジオクチルアニリンのようなアニリン類の塩、ピリジン、2, 6-ジメチルピリジン、2, 4, 6-トリメチルピリジン、ニコチンアミドのようなピリジン類の塩、グリシン、アラニン、プロリン、リジン、アルギニン、グルタミンのようなアミノ酸類の塩、シンコニジン、1-(1-ナフチル)エチルアミン、1-フェニルエチルアミンのような光学活性アミンの塩を挙げることができ、何れも1価あるいは2価の塩を包含する。好ましくは、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属の塩、アンモニウム塩、メチルアミン、シクロヘキシルアミンなどの1級アミンの塩である。

【0050】さらに、本発明の一般式(1)で表される化合物は、大気中に放置することにより水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物となる場合があるが、そのような塩も本発明に包含される。

【0051】一般式(2)で示されるBは、ピリミジン、プリン、アザプリンおよびデアザプリンからなる群から選択された天然または非天然型の塩基を示し、それらはハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基またはシアノ基によって置換されていてもよい。

【0052】置換基としてのハロゲン原子としては、塩素、フッ素、ヨウ素、臭素が例示される。アルキル基としては、メチル、エチル、プロピルなどの炭素数1～7の低級アルキル基が例示される。ハロアルキル基としては、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、ブロモメチル、ブロモエチルなどの炭素数1～7のアルキルを有するハロアルキル基が例示される。アルケニル基としては、ビニル、アリルなどの炭素数2～7のアルケニル基が例示される。ハロアルケニル基としては、ブロモビニル、クロロビニルなどの炭素数2～7のアルケニルを有するハロアルケニル基が例示される。アルキニル基としては、エチニル、プロピニルなどの炭素数2～7のアルキニル基が例示される。アルキルアミノ基としては、メチルアミノ、エチルアミノなどの炭素数1～7のアルキルを有するアルキルアミノ基が例示さ

れる。アルコキシ基としては、メトキシ、エトキシなどの炭素数1~7のアルコキシ基が例示される。アルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト、エチルメルカプトなどの炭素数1~7のアルキルを有するアルキルメルカプト基が例示される。アリール基としては、フェニル基；メチルフェニル、エチルフェニルなどの炭素数1~5のアルキルを有するアルキルフェニル基；メトキシフェニル、エトキシフェニルなどの炭素数1~5のアルコキシを有するアルコキシフェニル基；ジメチルアミノフェニル、ジエチルアミノフェニルなどの炭素数1~5のアルキルアミノを有するアルキルアミノフェニル基；クロロフェニル、ブロモフェニルなどのハロゲンフェニル基などが例示される。

【0053】ピリミジン塩基を具体的に例示すれば、シトシン、ウラシル、5-フルオロシトシン、5-フルオロウラシル、5-クロロシトシン、5-クロロウラシル、5-ブロモシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードシトシン、5-ヨードウラシル、5-メチルシトシン、5-メチルウラシル（チミン）、5-エチルシトシン、5-エチルウラシル、5-フルオロメチルシトシン、5-フルオロウラシル、5-トリフルオロシトシン、5-トリフルオロウラシル、5-ビニルウラシル、5-ブロモビニルウラシル、5-クロロビニルウラシル、5-エチニルシトシン、5-エチニルウラシル、5-プロピニルウラシル、ピリミジン-2-オン、4-ヒドロキシアミノピリミジン-2-オン、4-アミノオキシピリミジン-2-オン、4-メトキシピリミジン-2-オン、4-アセトキシピリミジン-2-オン、4-フルオロピリミジン-2-オン、5-フルオロピリミジン-2-オンなどが挙げられる。

【0054】プリン塩基を具体的に例示すれば、プリン、6-アミノプリン（アデニン）、6-ヒドロキシプリン、6-フルオロプリン、6-クロロプリン、6-メチルアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、6-トリフルオロメチルアミノプリン、6-ベンゾイルアミノプリン、6-アセチルアミノプリン、6-ヒドロキシアミノプリン、6-アミノオキシプリン、6-メトキシプリン、6-アセトキシプリン、6-ベンゾイルオキシプリン、6-メチルプリン、6-エチルプリン、6-トリフルオロメチルプリン、6-フェニルプリン、6-メルカプトプリン、6-メチルメルカプトプリン、6-アミノプリン-1-オキシド、6-ヒドロキシプリン-1-オキシド、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン（グアニン）、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2-アミノ-6-ヨードプリン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-メルカプトプリン、2-アミノ-6-メチルメルカプトプリン、2-アミノ-6-ヒドロキシアミノプリン、2-アミノ-6-メトキシプリン、2-アミノ-6-ベンゾイルオキシプリン、2-アミノ-6-アセトキシプリン、2-アミノ-6-メチル

プリン、2-アミノ-6-サイクロプロピルアミノメチルプリン、2-アミノ-6-フェニルプリン、2-アミノ-8-ブロモプリン、6-シアノプリン、6-アミノ-2-クロロプリン（2-クロロアデニン）、6-アミノ-2-フルオロプリン（2-フルオロアデニン）などが挙げられる。

【0055】アザプリン塩基およびデアザプリン塩基を具体的に例示すれば、6-アミノ-3-デアザプリン、6-アミノ-8-アザプリン、2-アミノ-6-ヒドロキシ-8-アザプリン、6-アミノ-7-デアザプリン、6-アミノ-1-デアザプリン、6-アミノ-2-アザプリンなどが挙げられる。

【0056】以下、反応条件について説明する。一般式(1)における R^1 および R^2 のヒドロキシメチル基、あるいは R^4 の水酸基の保護基として、前述の脂肪族アシル基、芳香族アシル基、アルコキシカルボニル基、または R^1 および R^2 のカルボキシル基の保護基として、前述の低級アルキル基を使用した場合には、溶媒として水溶性溶媒を使用する。

【0057】水溶性溶媒とは、通常の加水分解反応に使用されるものであれば特に限定はないが、具体的には、水、アルコール類、エーテル類または水と前記溶媒との混合液のいずれかであり、使用される溶媒としては、好ましくは、水、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノールのようなアルコール類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタン、ジグリムのようなエーテル類を用いることができる。これらの溶媒は一種または二種以上の混合溶液であってもよい。好ましくは水である。

【0058】保護基の脱離反応には、塩基を加えてもよく、加えることのできる塩基としては、好ましくは、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムのようなアルカリ金属炭酸塩、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのようなアルカリ金属水酸化物、アンモニア水、テトラ*n*-ブチルアンモニウム ヒドロキシドのような水酸化アンモニウム類、他の無機塩基類、1級のアルキルアミン、2級のアルキルアミン、3級のアルキルアミンなどが挙げられ、これらから選ばれた一種又は二種以上を用いる。

【0059】その際の反応温度および反応時間は出発物質や用いる塩基などによって異なり、特に限定はないが、好ましくは、-10℃から100℃で、1時間から5日間を終了する。反応温度、反応時間あるいは試薬の当量数を調節することにより、 R^3 の保護基を所望により残すこともできるし、同時に除去することもできる。

【0060】脱離反応後、1-リン酸化糖誘導体は、溶液の状態を得ることができる。ここで、脱離反応により副生した化合物が結晶として析出した場合は、ろ過などの操作により系外に除去することができる。

【0061】ただし、この操作は必ず行わなければならないものではなく、反応液中に含まれる副生物の量は、特に限定されるものではない。

【0062】こうして得られた1-リン酸化糖誘導体溶液に、塩基、反応触媒であるヌクレオシドホスホリラーゼ又は該酵素活性を有する微生物を加え、ヌクレオシドの合成を行う。適切なpHや温度などの反応条件ならびに管理幅は、目的とするヌクレオシド、基質である1-リン酸化糖誘導体と塩基、反応触媒であるヌクレオシドホスホリラーゼ又は該酵素活性を有する微生物、そしてリン酸を反応系より除外させるために添加する金属塩の種類とその特性により選ぶ。尚、このようにして製造したヌクレオシド化合物は、濃縮、晶析、溶解、電気透析処理、イオン交換樹脂や活性炭による吸脱着処理などの常法を適用することにより単離することができる。

【0063】次に、一般式(1)における R^1 および R^2 のヒドロキシメチル基、あるいは R^1 の水酸基の保護基として、前述のアラルキル基、アラルキルオキシカルボニル基または R^1 および R^2 のカルボキシル基の保護基として、前述のアラルキル基を使用した場合には、脱離反応は、例えば、金属触媒を使用して、接触還元を行って除去することができる。

【0064】触媒としては、好ましくは、パラジウム炭素、ラネーニッケル、酸化白金、白金黒、ロジウム-酸化アルミニウム、トリフェニルホスフィン-塩化ロジウム、パラジウム-硫酸バリウムなどを用いて行うことができる。

【0065】その場合の圧力は特に限定されるものではない。その際使用される溶媒としては、通常の加水分解反応に使用されるものであれば特に限定はないが、好ましくは、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノールのようなアルコール類、前述のエーテル類を用いることができる。これらの溶媒は一種または二種以上の混合溶液であってもよい。好ましくは、水である。

【0066】反応温度および反応時間は出発物質、触媒などによって異なり、特に限定はないが、好ましくは-10℃から100℃で、1時間から5日間で終了する。この場合、 R^3 の保護基は、通常除去されずに残すことができる。

【0067】脱離反応後、1-リン酸化糖誘導体は溶液の状態を得ることができる。ここで、脱離反応により副生した化合物が結晶として析出した場合は、濾過などの操作により系外に除去することができる。

【0068】ただし、この操作は必ず行わなければならないものではなく、反応液中に含まれる副生物の量は、特に限定されるものではない。

【0069】こうして得られた1-リン酸化糖誘導体溶液に、塩基、反応触媒であるヌクレオシドホスホリラーゼ又は該酵素活性を有する微生物を加え、ヌクレオシド

の合成を行う。適切なpHや温度などの反応条件ならびに管理幅は、目的とするヌクレオシド、基質である1-リン酸化糖誘導体と塩基、反応触媒であるヌクレオシドホスホリラーゼ又は該酵素活性を有する微生物、そしてリン酸を反応系より除外させるために添加する金属塩の種類とその特性により選ぶ。尚、このようにして製造したヌクレオシド化合物は、濃縮、晶析、溶解、電気透析処理、イオン交換樹脂や活性炭による吸脱着処理などの常法を適用することにより単離することができる。

【0070】その際、反応溶媒は、水溶性溶媒を使用し、水溶性溶媒とは、水、アルコール類、エーテル類または水と前記溶媒との混合液のいずれかであり、使用される溶媒としては、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノールのようなアルコール類、前述のエーテル類を用いることができる。これらの溶媒は一種または二種以上の混合溶液であってもよい。好ましくは、水であり、脱離反応と同一溶媒を使用することは、経済的にも有利である。

【0071】

【実施例】以下、実施例により、本発明を更に詳細に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0072】参考例1

3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸の合成

正リン酸 136.8gと2-ブタノン 2Lの混合物にトリn-ブチルアミン 90.6gとモルキュラーシープス4A 200gを加え、攪拌しながら5℃に冷却した。1時間攪拌後、3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ- α -D-リボシル クロリド(純度85%) 200gを加えて2時間攪拌し、2-ブタノン溶液を得た。2バッチ行い、得た溶液を混合した。この2-ブタノン溶液を5℃に冷却し、1時間攪拌後、結晶が析出しはじめ、濃厚な懸濁液となった。23時間後、トリn-ブチルアミン 518gを加えて析出晶を溶解し、モルキュラーシープスを濾去した。濾液を水 4.4Lで洗浄し、さらに水層をトルエン 2Lで抽出した。有機層を集め、氷冷し、シクロヘキシルアミン 175gを加えて、攪拌晶析した。1時間後、析出晶を濾取し、室温で減圧乾燥し、標記化合物のジシクロヘキシルアミン塩 426gを無色粉末として得た。収率78.1%(原料純度換算済み： α 体： β 体=96.9:3.1)。

【0073】実施例1

2'-デオキシアデノシンの合成(1)

エシェリヒア・コリK-12/XL-10株(Stratagene社)を50mlのLB培地に接種し、37℃で一夜培養した後集菌し、リゾチーム1mg/mlを含む溶菌液で溶菌した。溶菌液をフェノール処理した後、通常の方法によりエタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。生じたDNAの沈殿は、ガラス棒に巻き付け

て回収した後、洗浄し、大腸菌染色体DNAを調製した。

【0074】PCR用のプライマーには、エシェリヒア・コリの既知のdeoD遺伝子の塩基配列 (GenBank accession No. AE000508 (コード領域は塩基番号11531-12250)) に基づいて設計した配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。これらのプライマーの5'末端付近及び3'末端付近には、それぞれEcoRI及びHindIIIの制限酵素認識配列を有する。

【0075】制限酵素HindIIIで完全に消化した前記大腸菌染色体DNA 6 ng/μl 及びプライマー各 3 μM を含む 0.1 ml のPCR反応液を用いて、変性: 96℃、1分、アニーリング: 55℃、1分、伸長反応: 74℃、1分からなる反応サイクルを、30サイクルの条件でPCRを行なった。

【0076】上記反応産物及びプラスミドpUC18 (宝酒造(株)製)を、EcoRI及びHindIII消化し、ライゲーション・ハイ (東洋紡(株)製)を用いて連結した後、得られた組換えプラスミドを用いて、エシェリヒア・コリDH5αを形質転換した。形質転換株を、アンピシリン (Am) 50 μg/ml 及びX-Gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)を含むLB寒天培地で培養し、Am耐性で且つ白色コロニーとなった形質転換株を得た。このようにして得られた形質転換株よりプラスミドを抽出し、目的のDNA断片が挿入されたプラスミドを、pUC-PNP73と命名した。こうして得られた形質転換体を、エシェリヒア・コリ MT-10905と名づけた。

【0077】エシェリヒア・コリ MT-10905株をAm 50 μg/mlを含むLB培地100 mLで37℃・1晩振とう培養した。得られた培養液を13000 rpmで10 min遠心分離し、菌体を集めた。菌体を10 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 10 mLに懸濁し、超音波により破碎したものを酵素源として用いた。

【0078】参考例1で得た3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸17.7 gを7.5%水酸化カリウム水41.3 gに懸濁し、60℃で11時間攪拌した。この反応液を5℃まで冷却後、析出物を濾別し、水を加えて60 gの2-デオキシリボース-1-リン酸溶液を得た。酸でpHを8.5に調整し、アデニン (和光純薬製、特級) 2.8 g、上記のように調整した70 μlのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ生産菌の超音波破碎酵素液を添加し30℃で、24時間反応させた。反応液をアルカリでpH 10.5とし、65℃に加熱溶解した。以下に示すHPLC分析にて分析した結果、反応収率 91.4 モル%/アデニンであった。

【0079】HPLC分析条件

カラム; YMC-Pack CN A-514

カラム温度; 40℃

ポンプ流速; 1.0 ml/min

検出; UV 254 nm、

溶離液; 20 mM KH₂PO₄ (リン酸にてpH=3.8に調整): アセトニトリル=29:1 (V/V)

【0080】実施例2

2'-デオキシアデノシンの合成(2)

参考例1で得た3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸17.7 gを4.0%メチルアミン水41.4 gに懸濁し、60℃で11時間攪拌した。この反応液を5℃まで冷却後、析出物を濾別し、水を加えて60 gの2-デオキシリボース-1-リン酸溶液を得た。酸でpHを8.5に調整し、アデニン (和光純薬製、特級) 2.8 g、実施例1と同様にして得られた70 μlのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ生産菌の超音波破碎酵素液を添加し30℃で、24時間反応させた。反応液をアルカリでpH 10.5とし、65℃に加熱溶解した。実施例2に示すHPLC分析にて分析した結果、反応収率 93.6 モル%/アデニンであった。

【0081】実施例3

2'-デオキシアデノシンの合成(3)

実施例1で得た3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸17.7 gを10.5%アンモニア水41.4 gに懸濁し、60℃で11時間攪拌した。この反応液を5℃まで冷却後、析出物を濾別し、水を加えて2-デオキシ-α-D-リボース-1-リン酸溶液60 gを得た。酸でpHを8.5に調整し、アデニン (和光純薬製、特級) 2.8 g、実施例1と同様にして得られた70 μlのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ生産菌の超音波破碎酵素液を添加し30℃で、24時間反応させた。反応液をアルカリでpH 10.5とし、65℃に加熱溶解した。実施例1に示すHPLC分析にて分析した結果、反応収率 93.9 モル%/アデニンであった。

【0082】実施例4

2'-デオキシグアノシンの合成(1)

参考例1で得た3, 5-O-ビス(4-クロロベンゾイル)-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸38.5 gを7.5%水酸化カリウム水89.6 gに懸濁し、60℃で11時間攪拌した。この反応液を5℃まで冷却後、析出物を濾別し、水を加えて130.4 gの2-デオキシリボース-1-リン酸溶液を得、水169.6 g、リン酸二アンモニウム1.86 gを加え、塩酸でpHを8.5に調整した。この溶液に実施例1と同様にして得られた0.78 mlのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ生産菌の超音波破碎酵素液を加え、5.7%グアニン (和光純薬製、特級) NaOH液 105.6 g、

44. 3%塩化カルシウム（和光純薬、特級）29.6 gを3時間で同時に滴下し、その後6時間反応を行った。反応終了液を以下のHPLC分析にて分析した結果、収率 95.1モル%/グアニンであった。

【0083】HPLC分析条件

カラム；YMC-Pack ODS-A313

カラム温度；40℃

ポンプ流速；1.0ml/min

検出；UV254nm、

溶離液；20mM 酢酸アンモニウム（酢酸にてpH=3.5に調整）：メタノール=9：1（V/V）

【0084】実施例5

2'-デオキシグアニシンの合成（2）

参考例1で得た3,5-O-ビス（4-クロロベンゾイル）-2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸38.5gを4.0%メチルアミン水89.8gに懸濁し、6

0℃で11時間攪拌した。この反応液を5℃まで冷却後、析出晶を濾別し、水を加えて130.4gの2-デオキシリボース-1-リン酸溶液を得、水169.6g、リン酸二アンモニウム1.86gを加え、塩酸でpH8.5に調整した。この溶液に実施例1と同様にして得られた0.78mlのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ生産菌の超音波破碎酵素液を加え、5.7%グアニン（和光純薬製、特級）NaOH液105.6g、44.3%塩化カルシウム（和光純薬製、特級）29.6gを3時間で同時に滴下し、その後6時間反応を行った。反応終了液を実施例13のHPLC分析にて分析した結果、収率 95.7モル%/グアニンであった。

【0085】

【発明の効果】本発明は、今後さらに供給量が増すと考えられる有用なヌクレオシドの工業規模での製造を可能とした。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AF33 CA02 CA19 CC24 DA01

DA11 DA16

4C057 AA18 BB02 BB05 DD01 LL29

LL40 LL42